

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2004年9月23日 (23.09.2004)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2004/081232 A1

(51) 国际分类号⁷:

C12Q 1/68

(21) 国际申请号:

PCT/CN2003/000180

(22) 国际申请日:

2003年3月13日 (13.03.2003)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京市肿瘤防治研究所(BEIJING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) [CN/CN]; 中国北京市西城区大红罗厂街1号, Beijing 100034 (CN).

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 白桦(BAI, Hua) [CN/CN]; 中国北京市西城区大红罗厂街1号, Beijing 100034 (CN)。孙宇(SUN, Yu) [CN/CN]; 中国北京市海淀区阜成路52号北京肿瘤医院病理室, Beijing 100036 (CN)。周静(ZHOU, Jing) [CN/CN]; 中国北京市西城区大红罗厂街1号, Beijing 100034 (CN)。李吉友(LI, Jiyu) [CN/CN]; 中国北京市海淀区阜成路52号北京肿瘤医院病理室, Beijing 100036 (CN)。邓大君(DENG, Dajun) [CN/CN]; 中国北京市海淀区阜成路52A号公寓楼公寓4#-1101, Beijing 100036 (CN)。

(74) 代理人: 中国商标专利事务所(CHINA TRADEMARK & PATENT LAW OFFICE); 中国北京市西城区月坛南街14号月新大厦, Beijing 100045 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))对下列指定国:
- 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: THE METHOD OF IN VITRO DETECTING ABERRANT DYSPLASIA, AND THE ARTIFICIAL NUCLEOTIDES BEING USED

(54) 发明名称: 体外检测异型增生恶变潜能的方法及所用人工核苷酸序列

(57) Abstract: The present invention discloses the method of in vitro detecting aberrant dysplasia using methylation of p16CpG island nucleotides. The method comprises extracting target cell DNA from the tissue or liquid of body; detecting the methylation state of the sequences of p 16 CpG island nucleotides; determining the aberrant dysplasia in the tissue to be tested based on the sequences of methylated p16CpG nucleotides. The artificial sequences of nucleotides of p16CpG island being used were disclosed.

(57) 摘要

本发明公开利用p16 CpG岛甲基化体外检测异型增生恶变潜能的方法, 包括从组织或体液中提取靶细胞DNA; 检测p16 CpG岛核苷酸序列的甲基化状态; 根据甲基化的p16 CpG岛核苷酸序列, 确定待测组织有恶变潜能。本发明也公开了所用p16 CpG岛的人工核苷酸序列。

体外检测异型增生恶变潜能的方法 及所用人工核苷酸序列

技术领域

本发明涉及体外检测异型增生恶变潜能的方法，具体是指利用 p16 CpG 岛甲基化体外检测异型增生恶变潜能的方法，本发明也涉及所用 p16 CpG 岛的人工核苷酸序列。

背景技术

恶性肿瘤是威胁人类健康的重要原因，早期发现、早期诊断、早期治疗是减轻其危害的根本途径。口腔、食管、胃、肠、肝等众多脏器的恶性肿瘤都可从上皮异型增生 (dysplasia) 病变基础上发展而来，人们因而将异型增生称为“癌前病变”。然而，大部分的异型增生是一种静止的病变，相当一部分异型增生会自行消退，只有非常少的一部分异型增生会发展成癌。

目前对异型增生的诊断为形态学诊断，根据受检细胞或组织存在形态或/和结构异型性与否而诊断。这种诊断方法只能将异型增生区分为轻度、中度、重度 3 种。中、重度异型增生的恶变可能性比轻度的大，例如人胃粘膜中、重度异型增生患者 5 年后的胃癌发病率约为 7%，轻度者约为 3% (You WC, Li JY, Blot WJ, Chang YS, Jin ML, Gail MH, Zhang L, Liu WD, Ma JL, Hu YR, Mark SD, Correa P, Fraumeni JF, Xu GW. Evolution of precancerous lesions in a rural Chinese population at high risk of gastric cancer. Int J Cancer 1999 Nov 26; 83(5): 615-619)。形态学的诊断手段无法识别哪些病灶将进展成恶性肿瘤。国内外至今缺乏一种能够早期准确识别这种病变恶变潜能的技术。

与胃粘膜正常的人相比，中、重度胃粘膜异型增生患者患胃癌的危险度升高了 100 多倍。对癌症的过度恐惧导致人们将之与癌症等同对待，在胃癌高发的日本甚至常常采取非常的治疗方法—胃手术切除！其结果是 90% 以上无癌变可能的患者治疗过度，不仅浪费了医疗资源，而且使患者受到无可挽回的伤害。另外一方面，在经济不发达地区，人们又可能对之掉以轻心，导致可以避免的悲剧发生。显然，如果有一种能够早期识别这种异型增生恶变潜能的技术，不仅能够造福人类，产生重要的社会效益，也有可观的经济价

值。

在分子生物学飞速发展的今天，人们对癌变机制已经有了更加全面的认识。除去 p53、APC 等肿瘤抑制基因结构变异导致基因失活之外，人们发现 p15、p16、hMLH1 等基因 CpG 岛的异常甲基化也将导致这些基因沉默（即不表达）。由于一个基因的结构变异种类（点突变、缺失、异位等）和数量众多，而其 CpG 岛上沉默特异性的关键性 CpG 位点的甲基化状态则仅有甲基化和未甲基化 2 种状态。显然，相对于检测一个目的基因的结构变化而言，检测其 CpG 岛上关键性 CpG 位点的甲基化状态要简单许多。再则，并不是所有的结构变异都导致基因功能丧失，而基因异常沉默意味着功能完全丧失。这些都是目前肿瘤表遗传（epigenetics）研究日益受到重视的原因。

在有恶变潜能的异型增生等癌前病变组织中，至少一部分包含有少数发生了肿瘤相关基因异常甲基化沉默的启动细胞。如果能够证明待测病灶中有这种启动细胞的存在，就可能在肿瘤形成之前预测其恶变的可能性。逆转录 PCR 和蛋白质免疫组织化学染色技术都是检测组织中一个基因的表达状态的常规技术，但是这两种技术只适合于检测一个基因在待测组织多数细胞中的表达状态（例如肿瘤组织），其结果不能反映出组织中少数的变异细胞。

以肿瘤相关基因异常甲基化沉默为标志物预测肿瘤发生已经有成功的报道。例如，p15 异常甲基化沉默的骨髓异型增生综合征（MDS）患者易恶变为急性髓样白血病（AML）（Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, Nakahara Y, Saito H, Hotta T, Murate T. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. Blood 1997 Aug 15; 90(4): 1403-1409; Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, Vanrumbeke M, Fenaux P. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. Blood 1998 Apr 15;91(8):2985-2990); hMLH1 异常甲基化沉默是散发性微卫星高度不稳定（MSI-H）结肠癌、内膜癌和胃癌等的高危因素（Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Ward R. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. Gastroenterology 2002 May;122(5):1376-1387; Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. Am J Pathol 1999 Nov;155(5):1767-1772; Guo RJ, Arai H, Kitayama Y, Igarashi H, Hemmi H, Arai T, Hanai H, Sugimura H. Microsatellite instability of papillary subtype of human gastric adenocarcinoma and hMLH1 promoter hypermethylation in the surrounding mucosa. Pathol Int 2001 Apr;

51(4): 240-247), 在发达国家已运用于临床。目前已有通过测定患者血液等样品中的 p16 异常甲基化来进行恶性肿瘤辅助诊断的报道 (Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999 Jan 1;59(1):67-70; Wong IH, Lo YM, Zhang J, Liew CT, Ng MH, Wong N, Lai PB, Lau WY, Hjelm NM, Johnson PJ. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999 Jan 1;59(1):71-73; Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG, Sidransky D. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000 Feb 15;60(4):892-895), 尚未见利用 p16 异常甲基化来测定异型增生等癌前病变恶变潜能的报道。

发明的公开

本发明的目的是提供体外检测异型增生恶变潜能的方法。

为达上述目的, 本发明的技术方案是基于下述研究结果提出的:

假说: p16 基因是重要的肿瘤抑制基因, 其启动子区包含一 CpG 岛, 该 CpG 岛的甲基化状态能够调节该基因的表达。在正常细胞中该基因保持非甲基化的表达状态, 而发生异常甲基化时将导致该基因沉默。在许多肿瘤组织中常可检测到这种 p16 异常的甲基化沉默, 人胃癌组织中的检出率高达 40% (*Cancer Res* 2001, 61:2847)。我们在大鼠腺胃癌变模型上研究发现, 随着粘膜病变的加重, p16 异常甲基化率进行性增加, 慢性萎缩性胃炎、异型增生、胃腺瘤、胃癌的发生率分别为 16.7%, 37.5%, 65%, 85.2% (*Mut Res* 2003, 535:73)。这些说明 p16 异常甲基化发生在胃粘膜癌变早期, 在胃癌的发生上可能发挥重要作用。因此, 我们提出了 p16 异常甲基化可能用于识别有恶变潜能的癌前病变假说。

验证: 我们在人群胃癌回顾性前瞻队列研究中, 开展了用该指标识别胃粘膜上皮异型增生恶变潜能的探索研究, 发现 5 例 p16 异常甲基化检出阳性的胃粘膜上皮轻度异型增生患者 5 年后全部发生胃腺癌, 而在 21 例未恶变成胃癌的配对对照患者 5 年前胃粘膜上皮轻度异型增生病灶中均未检出 p16 异常甲基化。该结果证明, 通过检测病灶中 p16 甲基化 CpG 岛序列的存在, 能够准确地预测这种病灶将恶变。如果患者异型增生等癌前病变组织中存在这种 p16 异常甲基化沉默的细胞, 将进展为恶性肿瘤。

本发明体外检测异型增生恶变潜能的方法，包括以下步骤：

- (1) 从组织或体液中提取靶细胞 DNA；
- (2) 检测 p16 CpG 岛核苷酸序列的甲基化状态；
- (3) 根据甲基化的 p16 CpG 岛核苷酸序列，确定待测组织有恶变潜能。

本发明利体外检测异型增生恶变潜能的方法的特征是：利用甲基化特异性 PCR(MSP) 技术检测 p16 CpG 岛核苷酸序列的甲基化状态。

本发明体外检测异型增生病灶恶变潜能的方法的特征是：甲基化特异性 PCR(MSP) 检测的一对甲基化引物是根据 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 设计并合成能够与人 p16 CpG 岛甲基化修饰后靶序列配对的一对引物；甲基化特异性 PCR(MSP) 检测的一对非甲基化引物是根据 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 设计并合成能够与人 p16 CpG 岛非甲基化修饰后靶序列配对的一对引物。

本发明的另一目的是提供了人工核苷酸序列 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4, 它们可以做为甲基化特异性 PCR(MSP) 检测引物设计的基础。

本发明的病灶恶变潜能判断标准：

- (1) 在 p16 未甲基化阴性对照组织检不出甲基化 p16 CpG 岛序列的前提下，如果在待测病灶样品 DNA 中能够检出甲基化的 p16 CpG 岛序列，该病灶极可能恶变；
- (2) 在 p16 甲基化阳性对照组织能检出甲基化 p16 CpG 岛序列的前提下，如果在待测病灶样品 DNA 中仅能够检出未甲基化 p16 CpG 岛序列，该样品中不含甲基化 p16 CpG 岛序列，不排除该病灶恶变的可能性；
- (3) 如果在待测样品中甲基化和非甲基化 p16 CpG 岛序列均未检出，需要重新测定。

本发明的优点是：在国际上首次发现，甲基化 p16 CpG 岛序列是一种能够用来准确体外预测上皮异型增生病灶恶变潜能的标志物。特别是利用甲基化特异性 PCR 技术 (MSP)，可以灵敏地检测出这种异型增生组织标本中的少

数 p16 异常甲基化细胞，能够快速检出异型增生等病变细胞样品中是否含有该特殊序列，所需靶细胞数量小，特异性极强，能在肿瘤发生前 5 年就预测出患癌可能性，从而在肿瘤尚未发生之前，测定出这种异型增生组织的癌变潜能。这是继 hMLH1 异常甲基化之后的又一个可用于预测癌前病灶恶变潜能的生物学标志物。由于肿瘤组织中 p16 异常甲基化检出率高于 hMLH1 异常甲基化检出率 4 倍（20~40% 比 5~10%），发生变异的肿瘤谱更宽，这些展示出本发明的运用前景将更加广阔。

为了进一步理解本发明的实质，下面结合附图及具体实施方式对本发明做一详细的说明。

附图的简要说明

图 1 是本发明一部分样品的石蜡组织甲基化 p16 CpG 岛靶序列 甲基化特异 PCR (MSP) 检测结果。

- SEQ ID NO:1 本发明 p16 CpG 岛修饰后的甲基化反意义核苷酸序列。
- SEQ ID NO:2 本发明 p16 CpG 岛修饰后的非甲基化反意义核苷酸序列。
- SEQ ID NO:3 本发明 p16 CpG 岛修饰后的甲基化正意义核苷酸序列。
- SEQ ID NO:4 本发明 p16 CpG 岛修饰后的非甲基化正意义核苷酸序列。

具体实施方式

实施例 通过胃粘膜上皮异型增生病灶细胞 p16 CpG 岛

甲基化序列体外检测其恶变潜能

- 1、实验对象：21 例新发现胃癌患者患癌 5 年前的胃镜活检组织石蜡包埋标本，这些标本的病理诊断结果为胃粘膜上皮轻度异型增生；21 例经年龄、性别、生活习惯等因素配对的、非胃癌对照患者 5 年前的胃镜活检组织石蜡包埋标本，这些标本的病理诊断同样为胃粘膜上皮轻度异型增生；经亚硫酸氢钠一测序法证明其 p16 CpG 岛已经甲基化的和未甲基化的阳性和阴性对照标本；

- 2、获取病灶细胞：用组织切片工具，切取不小于 0.5 mm^3 体积的固定靶组织（例如正式制片前或制片过程中废弃的组织数片），收集到硅化的微型离心管（ 1.5 ml ）中，二甲苯脱蜡，酒精梯度水化；
- 3、提取细胞 DNA：加入 $300 \mu\text{l}$ 组织细胞裂解液（含 10 mM Tris.Cl/pH 7.6、 10 mM NaCl、 10 mM EDTA 和 0.5% SDS），再加入蛋白酶 K $10 \mu\text{l}$ (20 mg/ml)， 37°C 或 55°C 过夜消化， 100°C 灭活蛋白酶，抽提 DNA 约 $10\sim 50 \text{ ng}$ ；
- 4、化学修饰未甲基化胞嘧啶
 - 1) 用无菌三蒸水 $50 \mu\text{l}$ 溶解上述 DNA 样品；
 - 2) 各管加入 3 M NaOH $5.5 \mu\text{l}$ ，混匀， $50\sim 55^\circ\text{C}$ 水浴 15 min ，以使 DNA 变性解链；
 - 3) 各管加入抗氧化剂—新鲜配置的 10 mM 对苯二酚 $30 \mu\text{l}$ ，混匀；
 - 4) 各管加入新鲜配置的 3.6 M NaHSO₃ $520 \mu\text{l}$ ，混匀，再加入 $200 \mu\text{l}$ 液体石蜡阻止管内液体蒸发，置 $50^\circ\text{C}\sim 55^\circ\text{C}$ 水浴中过夜修饰未甲基化胞嘧啶为尿嘧啶；
 - 5) 吸去顶层液体石蜡，用 DNA 纯化试剂盒（如 Promega Wizard DNA Clean-Up System, A7280），按说明书所示提取修饰后 DNA：加入混匀的树脂 1 ml ，混匀后静置 5 min ；将树脂-DNA 混合物转移至下接微柱的注射管内，抽真空法滤去液相，并将 DNA 等固相转移到微柱滤膜上；加入 80% 异丙醇 2 ml ，抽真空；弃注射管，将微柱套入 1.5 ml 离心管上，高速离心（ 10000 g 20 秒 ）去除柱内残留液体；将微柱转移至新离心管上，向微柱内加入 80°C 无菌三蒸水 $50 \mu\text{l}$ ，静置 15 min ，高速离心（ 10000 g 20 秒 ），收集洗脱液；再向微柱内加入 80°C 无菌三蒸水 $50 \mu\text{l}$ ，静置 15 min ，高速离心（ 10000 g 20 秒 ），合并洗脱液；
 - 6) 向各管加入 3 M NaOH $11 \mu\text{l}$ ，混匀， 37°C 温浴 15 min ，以阻止修饰反应；
 - 7) 向各管加入 5 M 醋酸盐 $166 \mu\text{l}$ ， 100% 冰乙醇 $750 \mu\text{l}$ ，混匀， -20°C 沉淀 4 小时 ， 10000 g 离心 30 分钟 ，弃上清；向各管加入 $200 \mu\text{l}$ 80% 冰乙醇，混匀，再离心，弃上清；
 - 8) 干燥后用 $3\sim 6 \mu\text{l}$ 无菌三蒸水或 TE 缓冲液溶解修饰纯化后样品 DNA， -20°C 保存备用；
- 5、PCR 引物设计：按人甲基化和未甲基化 p16 CpG 岛修饰后序列（SEQ ID

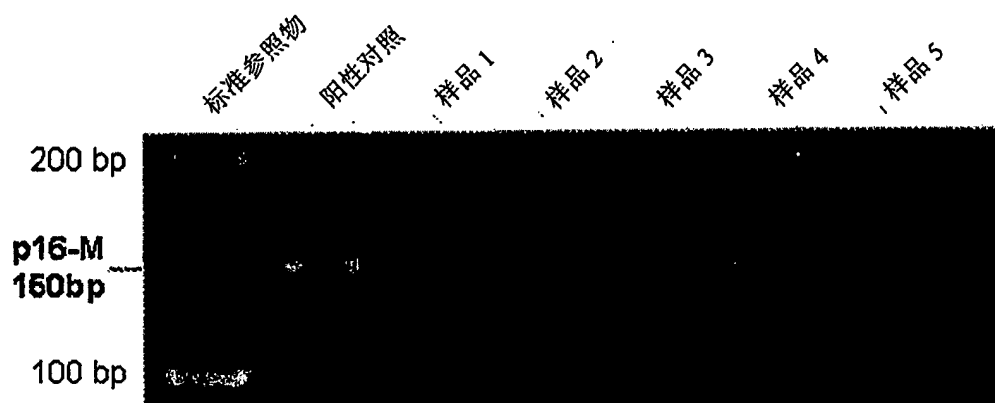
- NO:1, SEQ ID NO:2, SEQI ID NO:3 和 SEQ ID NO:4), 分别设计合成其 3' 端可与该序列所含甲基化 CpG 位点和非甲基化 CpG 位点特异性互补的 PCR 引物, 上游和下游的甲基化引物 5' -ttattagagg gtggggCgga tCgC-3' 和 5' -GaccccGaac cGcGaccGta a-3'; 上游和下游的非甲基化引物 5' -ttattagagg gtggggTgga tTgT-3' 和 5' -cAaccccAaa ccAcAaccAt aa-3';
- 6、PCR 扩增: 对修饰后待测样品中的甲基化 p16 CpG 岛进行热启动 PCR 扩增, 利用凝胶成像方法显示甲基化 p16 CpG 岛扩增产物的存在, PCR 测序法验证; 在甲基化 p16 CpG 岛测定结果为阴性时, 再进行非甲基化 p16 CpG 岛修饰后序列扩增, 以证明待测样品中 p16 CpG 岛是以非甲基化模板的形式存在;
- 7、结果: 在 21 例 5 年后恶变成胃癌的轻度异型增生病灶中, 5 例为 p16 甲基化 CpG 岛序列检出阳性 (图 1); 21 例 5 年后未恶变的轻度异型增生病灶中, 均未检出 p16 甲基化 CpG 岛序列, 差异有统计学显著性 ($p=0.024$)。p16 甲基化 CpG 岛序列检出阴性样品仅能检出非甲基化 p16 序列;
- 8、结论: 在预测胃粘膜上皮异型增生患者恶变潜能上, 本方法的特异性可达 100%, 即未见 p16 异常甲基化阳性而未恶变的胃粘膜异型增生病灶患者。虽然预测全部胃粘膜上皮异型增生病灶恶变的灵敏度仅达 24%, 但是对于 p16 异常甲基化的胃粘膜上皮异型增生患者而言, 预测其恶变的灵敏度也可达 100%。即 5 例 5 年前 p16 甲基化 CpG 岛序列阳性的胃粘膜上皮异型增生患者, 5 年后全部恶变为胃癌。
- 9、胃液脱落细胞检查法: 利用离心或过滤法从空腹胃液中收集的脱落细胞, 按上述步骤 3~6 操作, 同样能够检出患者上消化道上皮中是否含有 p16 异常甲基化的 CpG 岛序列。

本领域技术人员可以理解, 任何可以检测 p16 CpG 岛甲基化的方法均可以用于体外检测异型增生病灶恶变潜能, 而实施例所示的甲基化特异性 PCR 技术只是示例性说明实现本发明的最佳方式。

权 利 要 求

- 1、体外检测异型增生恶变潜能的方法，包括以下步骤：
 - (1) 从组织或体液中提取靶细胞 DNA；
 - (2) 检测 p16 CpG 岛核苷酸序列的甲基化状态；
 - (3) 根据甲基化的 p16 CpG 岛核苷酸序列，确定待测组织有恶变潜能。
- 2、权利要求 1 所述的体外检测异型增生病灶恶变潜能的方法，其特征是：利用甲基化特异性 PCR 技术检测 p16 CpG 岛核苷酸序列的甲基化状态。
- 3、权利要求 2 所述的体外检测异型增生病灶恶变潜能的方法，其特征是：甲基化特异性 PCR 检测的一对甲基化引物是分别与 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 序列任一区段配对的一对引物；甲基化特异性 PCR 检测的一对非甲基化引物是分别与 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 任一区段配对的一对引物。
- 4、p16 CpG 岛修饰后的甲基化反意义核苷酸序列 SEQ ID NO:1。
- 5、p16 CpG 岛修饰后的非甲基化反意义核苷酸序列 SEQ ID NO:2。
- 6、p16 CpG 岛修饰后的甲基化正意义核苷酸序列 SEQ ID NO:3。
- 7、p16 CpG 岛修饰后的非甲基化正意义核苷酸序列 SEQ ID NO:4。

1/1



序列表

<110> 北京市肿瘤防治研究所

5

<120>体外检测异型增生恶变潜能的方法及所用人工核苷酸序列

<130> CNB1U03000217

10 <160> 4

<210> 1

<211> 359

<212> DNA

15 <213> 人工序列

<400> 1

agaggagggg ttggttggtt attagagggt ggggcggatc gcgtgcgttc ggcggttgcg	60
gagaggggga gagtaggtag cgggcggcgg ggagtagtat ggagtcggcg gcggggagta	120
20 gtatggagtt ttcggttgat tggttggtta cggtcgcggt tcggggtcgg gtagaggagg	180
tgccggcggtt gttggaggcg ggggcggttg ttaacgtatc gaatagttac ggtcggaggt	240
cgathtaggt gggtagaggg tttgtagcgg gagtagggga tggcgggcga ttttgaggga	300
cgaagtttgt aggggaattg gaattaggtta gcgtttcgat ttttcggaaa aaggggagg	359

25 <210> 2

<211> 359

<212> DNA

<213> 人工序列

30 <400> 2

agaggagggg ttggttggtt attagagggt ggggtggatt gtgtgtgttt ggtggttg	60
gagaggggga gagtaggtag tgggtggtgg ggagtagtat ggagttggtg gtggggagta	120
gtatggagtt tttggttgat tggttggtta tggttggtgt ttggggttgg gtagaggagg	180

	tgtgggtggt gttggaggtg ggggtgttgt ttaatgtatt gaatagttat ggttggaggt	240
	tgatttaggt gggtagaggg tttgtagtgg gagtagggga tggtaggtga ttttgagga	300
5	tgaagtttgt aggggaattg gaattaggtg gtgttttgat tttttgaaa aaggggagg	359
	<210> 3	
	<211> 359	
	<212> DNA	
10	<213> 人工序列	
	<400> 3	
	tttttttttt tttcggagaa tcgaagcgtt atttgatttt aatttttttg taaatttcgt	60
	tttttagagt cgttcgttat tttttgtttt cgttgtagat tttttattta tttggatcgg	120
15	ttttcgatcg taattattcg gtgcgttggg tagcgttttc gtttttagta gcgttcgtat	180
	tttttttatt cgatttcggg tcgcggtcgt ggtaggttag ttagtcgaag gttttatgtt	240
	gtttttcgtc gtcggtttta tgttgttttt cgtcgttcgt tgtttgtttt ttttttttc	300
	gtagtcgtcg agcgtacgcg gttcgtttta ttttttggtg attagttagt ttttttttt	359
20	<210> 4	
	<211> 359	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
25	<400> 4	
	tttttttttt ttttggagaa ttgaagtgtt atttgatttt aatttttttg taaattttgt	60
	tttttagagt tgtttgttat tttttgtttt tgtttagat tttttattta tttggattgg	120
	tttttgattg taattatttg gtgtgttggg tagtgttttt gtttttagta gtgtttgtat	180
	tttttttatt tgattttggg ttgtggttgt ggtaggttag ttagttgaag gttttatgtt	240
30	gttttttggt gttggtttta tgttgttttt tgttgtttgt tgtttgtttt ttttttttt	300
	gtagttgttg agtgtatgtg gtttgtttta ttttttggtg attagttagt ttttttttt	359

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/CN03/00180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12Q1/68

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

CRPS, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	WO , A2, 0144504 (ASTRAZENECA AB et al) 21.June 2001 , See the whole document	1-7
X	WO, A2, 0142493 (EPIGENOMICS AG et al) 14.June 2001, See the whole document	1-7
X	WO, A1, 0119845 (UNIV JOHNS HOPKINS SCHOOL MEDICINE) 22.March 2001, See the whole document	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27March 2003(27.03.03)

Date of mailing of the international search report

17 APR 2003 (17.04.03)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

PAN, aiquan

Telephone No. 86-10-62093906



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

PCT/CN03/00180

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO -A2- 0144504	21-06-01	AU-A-200121948	25-06-01
WO-A2- 0142493	14-06-01	DE-A1-19959691	16-08-01
WO-A1- 0119845	22-03-01	AU-A-200075869	17-04-01

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/00180

A. 主题的分类

Int.Cl⁷: C12Q1/68

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

Int.Cl⁷: C12Q1/68

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI,CNPS

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	WO , A2, 0144504 (ASTRAZENECA AB 等) 21.6 月 2001 , 参见全文	1-7
X	WO, A2, 0142493 (EPIGENOMICS AG 等) 14.6 月 2001, 参见全文	1-7
X	WO, A1, 0119845 (约翰霍普金医学院) 22.3 月 2001, 参见全文	1-7

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

"A" 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件
"E" 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的
"L" 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

"P" 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

"T" 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

"X" 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

"Y" 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

27.3 月 2003(27.3.03)

国际检索报告邮寄日期

17. 4 月 2003(17.04.03)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-010-62019451

授权官员:

潘爱群

电话号码: 86-10-62093906



国际申请号

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO -A2- 0144504	21-06-01	AU-A-200121948	25-06-01
WO-A2- 0142493	14-06-01	DE-A1-19959691	16-08-01
WO-A1- 0119845	22-03-01	AU-A-200075869	17-04-01